

14 DEC

312

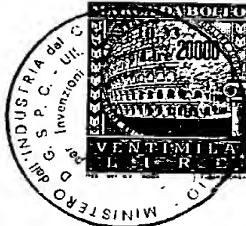


TCT/EP00/05066
 09/98085 Mod. C.E. - 1-4-7
 EP00/5066

MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO
DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

REC'D	25 SEP 2000
WIPO	PCT

4



INV. IND.

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per

N. MI99 A 002197

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

*Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali
 depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
 risultano dall'accluso processo verbale di deposito*

Roma, il 28 GIU. 2000

IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE
 IL DIRIGENTE

Dr. Marcus G. Conte

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

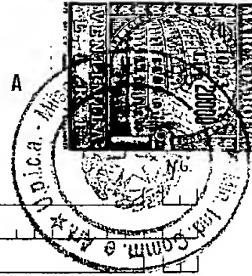
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO A

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione **PHARMAPRODUCTS UK LIMITED**Residenza **Liverpool (Gran Bretagna) (GB)**

codice



2) Denominazione

Residenza

codice

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

Bianchetti Giuseppe ed altri

cognome nome

cod. fiscale

denominazione studio di appartenenza

Bianchetti • Bracco • Minoja s.r.l.via **Rossini**

n. 8

città **Milano**cap **20122**(prov) **MI**

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/scl) **4111**gruppo/sottogruppo **1111/1111****"10-formiltetraidrofolato deidrogenasi come agente terapeutico"**ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: **SI** **NO** SE ISTANZA: DATA **11/11/11**N° PROTOCOLLO **11111111**

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) **Bartorelli Alberto**

3)

2)

4)

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/R

1) _____

11/11/11

2) _____

11/11/11

SCIOLIMENTO RISERVE	
Data	N° Protocollo
11/11/11	11111111
11/11/11	11111111

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

11/11/11	11/11/11
11/11/11	11/11/11
11/11/11	11/11/11

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) **2** PROV n. pag. **06**

riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare).....

Doc. 2) **0** PROV n. tav. **11**

disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare).....

Doc. 3) **0** **26**

lettera d'incarico, procura o rinnovo di procura generale.....

Doc. 4) **0** RIS

designazione inventore

Doc. 5) **0** RIS

documenti di priorità con traduzione in italiano

Doc. 6) **0** RIS

autorizzazione o atto di cessione

Doc. 7) **0**

nominativo completo del richiedente

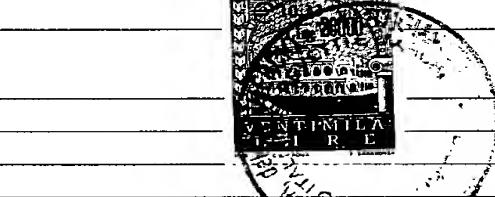
8) attestato di versamento, totale lire

Trecentoquindicimila#

obbligatorio

COMPILATO IL **20/10/1999**

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

Minoja FabrizioCONTINUA SI/NO **NO**DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO **SI**

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI

MILANOcodice **15**

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

MT99A 002197

Reg. A.

L'anno millenovectento

NOVANTANOVE

il giorno

VENTI

del mese di

OTTOBRE

Il(i) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n.

00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopriportato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

11/11/11	11/11/11
11/11/11	11/11/11

Bifia MichelIL DEPOSITANTE
timbro
dell'Ufficio**L'UFFICIALE ROGANTE****CORTONESI MAURIZIO**

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE SCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

M199A10021

REG. A

DATA DI DEPOSITO

20/10/1999

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

20/10/1999

D. TITOLO

"10-FORMILTETRAIDROFOLATO DEIDROGENASI COME AGENTE TERAPEUTICO"

L. RIASSUNTO

Si descrive l'uso di 10-formiltetraidrofolato deidrogenasi come agente terapeutico, in particolare come agente citotossico e antitumorale e relativo metodo di preparazione.

M. DISEGNO



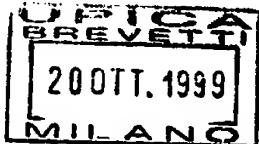
607 M Descrizione dell'invenzione industriale avente per titolo:

M/as **"10-FORMILTETRAIDROFOLATO DEIDROGENASI COME AGENTE
TERAPEUTICO"**

MI 9 A 002197

a nome : **PHARMAPRODUCTS UK LIMITED**

con sede in: Liverpool (Gran Bretagna)



* *

La presente invenzione riguarda l'uso di 10-formiltetraidrofolato deidrogenasi come agente terapeutico, in particolare come agente citotossico e antitumorale.

La 10-formiltetraidrofolato deidrogenasi è un enzima, presente nel fegato e nel sistema nervoso di mammiferi, di cui non è stato finora descritto alcun uso terapeutico.

Il cDNA di 10-formiltetraidrofolato deidrogenasi di ratto è stato descritto in J. Biol. Chem. 266(8), 4965-4973, 1991, mentre più recentemente è stato descritto il cDNA dello stesso enzima umano (Biochem. Mol. Biol. Int., 47(3), 407-415, 1999).

Metodi per la preparazione dell'enzima ricombinante sono inoltre noti da Protein Expression Purif. 6, 457-64, 1995 e Biochem. J. 306(3), 651-5, 1995.

Si è ora trovato che la 10-formiltetraidrofolato deidrogenasi di mammifero è in grado di indurre, se somministrata a pazienti o animali portatori di tumori, una marcata risposta citotossica nei confronti di cellule tumorali.

Tale citotossicità sembra mediata da anticorpi citotossici nei confronti di cellule di tumori umani, in particolare di carcinomi e adenocarcinomi.

La citotossicità è qualificabile in vitro su cellule HT-29, Kato III e

HepG2 utilizzando metodi convenzionali, basati ad esempio all'uso di kit commerciali quali il kit CDC μ K (Pharmaproduct). In particolare, si notava la comparsa di citotossicità nel siero di conigli già dopo un primo trattamento con l'enzima (1 mg/animale in soluzione fisiologica) su cellule Jurkat e Kato III.

L'invenzione riguarda pertanto anche composizioni farmaceutiche contenenti come ingrediente attivo una dose efficace di 10-formiltetraidrofolato deidrogenasi.

Le composizioni dell'invenzione potranno essere somministrate a pazienti affetti da tumori utilizzando le vie di somministrazione convenzionali per proteine e polipeptidi, ad esempio la via sottocutanea o intramuscolare. Il trattamento può essere ripetuto ed è preferibile un trattamento che prevede somministrazioni distanziate di una-due settimane di dosi comprese tra 0,1 e 20 mg di enzima.

Si è inoltre sorprendentemente trovato che è possibile indurre elevata citotossicità anche somministrando l'enzima a dosaggi molto bassi, dell'ordine di $1,10^4$ - $1,10^{10}$ g, per via sublinguale, sotto forma di granuli o gocce di soluzioni o suspensioni idroalcoliche all'1% di etanolo, con concentrazioni di principio attivo variabili da 10^{-6} a 10^{-10} M.

La 10-formiltetraidrofolato deidrogenasi può essere preparato con metodi convenzionali di DNA ricombinante oppure può essere estratta da fegato di animali, ad esempio da fegato di bovini, ovini o suini. Il fegato di capra si è dimostrato in particolare una fonte abbondante di questo enzima.

Il procedimento di estrazione prevede il trattamento dei fegati con soluzioni tamponate a pH 7.4 (PBS) seguito da precipitazione con polietilenglicol 6000 al 15%, cromatografia su TSK-DEAE o DEAE-Sephacell

a pH 8, eluizione con NaCl 0,3 M e purificazione su TSK SW3000.

Il seguente esempio illustra l'invenzione in maggior dettaglio.

ESEMPIO

Estrazione

50 gr di fegato di capra vengono omogenati e ripresi ad un volume finale con 400 ml di PBS 0,01 M pH 7,2.

Si agita per 30 minuti a 4°C e si centrifuga su JA14 a 14,000 RPM per 30 minuti.

Si filtra su bukner; 1,2 µm finale si 0,45 µm.

Volume: 340 ml conc. 10,9 mg/ml.

Precipitazione frazionata PEG 6000.

I 336 ml del campione sopraindicato, vengono trattati con PEG 6000 in polvere al 5% (16,8g).

Si agita per 1 ora a 4°C. Si centrifuga su J 6 a 4000 g per 30'.

Il pellet viene ripreso con 61 ml di Tris/HCl 0,03 M pH 8, mentre il surnatante (340 ml) viene riprecipitato con PEG 6000 al 5% (17 g), quindi 10% finale, agitando per 1 ora a 4°C.

Si centrifuga su J6 a 4000 g per 30' e si riprende il pellet con 62 ml di Tris/HCl 0,03 M pH 8.

Il surnatante 345 ml viene trattato con PEG 6000 al 5% (17,25 g) quindi finale 15%, agitando per 1 ora a 4°C.

Si centrifuga su J6 a 4000 g per 30'.

Il surnatante viene eliminato, mentre il pellet viene ripreso con 200 ml di Tris/HCl 0,03 M pH 8.

Pellet PEG 5% volume: 61 ml conc. 9,34 mg/ml.

Pellet PEG 10% volume: 62 ml conc. 13 mg/ml.

Pellet PEG 15% volume: 200 ml conc. 3,38 mg/ml.

DEAE - Sephadex

Circa 150 ml di resina DEAE-S. vengono equilibrati in tampone Tris/HCl 0,03 M pH 8.

Si incuba la resina con il campione PEG 15% per 30 minuti a t.a. + 200 ml di lavaggio.

LEG 1: 200 ml Tris/HCl 0,5 M pH 8 per 30 minuti a t.a. + 200 ml di lavaggio.

LEG 2: 200 ml Tris/HCl 0,03 M pH 8 + 0,3 M NaCl per 30 minuti a t.a. + 200 ml di lavaggio.

LEG 3: 200 ml Tris/HCl 0,03 M pH 8 + 1 M NaCl per 30 minuti a t.a. + 200 ml di lavaggio.

Si ottengono così i seguenti campioni:

S.B. volume: circa 400 ml conc: 294 γ/ml.

LEG 1 volume: circa 400 ml conc: 1,14 mg/ml.

LEG 2 volume: circa 400 ml conc: su PM 30.

LEG 3 volume: circa 400 ml conc: 137 γ/ml.

Il LEG 2 viene conc. su PM 30 ad un volume finale di circa 20 ml alla conc. di circa 3,6 mg/ml.

SW3000 prep.

Il LEG 2 da DEAE-S. sopraccitato, viene purificato in SW3000 prep. (10 cariche da 2 ml).

Si eluiscono quattro frazioni, la seconda delle quali viene concentrata su PM 30 e dializzata contro H₂O a vol. finale di circa 2 ml alla conc. di circa 1,5 mg/ml.



RIVENDICAZIONI

1. 10-Formiltetraidrofolato deidrogenasi come agente terapeutico.
2. 10-formiltetraidrofolato deidrogenasi come agente antitumorale.
3. Uso di 10-formiltetraidrofolato deidrogenasi per la preparazione di medicamenti citotossici e antitumorali.

Milano, 20 ottobre 1999

Il Mandatario
(Minoja Fabrizio)
di Bianchetti • Bracco • Minoja S.r.l.

